

**JAKSOTTAISEN ANDROGEENISALPAUKSEN VAIKUTUS
ERG:N ILMENTYMISEEN LEVINNEESSÄ
ETURAUHASSYÖVÄSSÄ**

Olli Jouppila
Syventävien opintojen kirjallinen työ
Tampereen yliopisto
Lääketieteen yksikkö
Molecular Biology of Prostate Cancer group
Tammikuu 2015

Tampereen yliopisto
Lääketieteen yksikkö
Molecular Biology of Prostate Cancer group

JOUPPILA OLLI: JAKSOTTAISEN ANDROGEENISALPAUKSEN VAIKUTUS *ERG*:N ILMENTYMISEEN LEVINNEESSÄ ETURAUHASSYÖVÄSSÄ

Kirjallinen työ, 19 s.
Ohjaaja: professori Tapio Visakorpi

Tammikuu 2015

Avainsanat: fuusiogeeni, kastroatioresistenssi

Taustaa: Levinneen eturauhassyövän ensisijainen hoitomuoto on kirurginen tai lääkkeellinen kastroatio. Syöpäkudos yleensä reagoi kastroatioon aluksi, mutta muuttuu vähitellen kastroatiolle resistentiksi. *ERG* on merkittävä onkogeeni, joka on yliekspressoitunut noin joka toisessa eturauhassyövässä. Yleisin taustalla oleva mekanismi on fuusioituminen AR-säädellyn *TMPRSS2*-geenin kanssa, jolloin myös *ERG* tulee AR-säädellyksi. Tämä tutkimus pyrki selvittämään, mitä *ERG*:n ilmentymiselle syöpäkudoksessa tapahtuu jaksottaisen androgeenisalpauksen aikana.

Aineisto ja menetelmät: Aineisto koostui eturauhasbiopsioista, jotka saatiin kuudelta eturauhassyöpäpotilaalta jaksottaisen androgeenisalpauksen yhteydessä. Kustakin biopsiasta tehtiin neljä leikettä, joista kolme värjättiin immunohistokemiallisesti (*ERG*, n = 23; PSA, n = 19; AR, n = 22) ja yhdestä tehtiin HE-värjäys. Immunohistokemiallisten värjäysten intensiteetti arvioitiin asteikolla 0, 1 tai 2.

Tulokset: *ERG*-ekspression hoidollisesta vaihtelusta jaksottaisen androgeenisalpauksen hoito- ja taukojaksojen välillä ei saada viitteitä.

Johtopäätökset: *ERG*-ekspression vakaus jaksottaisen androgeenisalpauksen aikana viittaa siihen, että AR-signaali jatkuu syöpäkudoksessa kastroatiosta huolimatta. Aineiston pieni koko tulee kuitenkin huomioida tulosten tulkinnassa.

SISÄLLYS

1 TAUSTAA	1
1.1 Jaksottainen androgeenisalpaus	1
1.2 PSA	2
1.3 AR	2
1.4 ERG	3
1.4.1 Yleisyys	3
1.4.2 Fuusiomekanismit	3
1.4.3 Vaikutus solutasolla	4
1.4.4 Vaikutus taudin ennusteeseen	4
1.5 Tutkimuksen tarkoitus	5
 2 AINEISTO JA MENETELMÄT	 6
2.1 Aineisto	6
2.2 Menetelmät	7
2.3 Värjäytymisintensiteetin arviointi	8
 3 TULOKSET	 9
3.1 ERG-ekspressio	9
3.2 PSA- ja AR-ekspressio	11
 4 POHDINTAA	 12
 KIRJALLISUUS	 14

1 TAUSTAA

Eturauhassyöpä on miesten yleisin syöpä Suomessa. Vuonna 2012 siihen sairastui 4659 ja kuoli 855 miestä. Eturauhassyöpä on keuhkosyövän jälkeen toiseksi yleisin syöpäkuoleman syy Suomessa. (Suomen Syöpärekisteri.) Kehittyneistä hoitomenetelmistä huolimatta levinneen eturauhassyövän hoito on edelleen haasteellista. Levinnyttä eturauhassyöpää sairastavien ensisijainen hoito on kirurginen tai lääkkeellinen kastratio, johon liittyy hankalia sivuoireita. Näistä keskeisimpiä ovat kuumat aallot, luuston haurastuminen, libidon heikkeneminen, erektiohäiriöt, painonnousu ja gynekomastia (Sharifi ym. 2005). Lisäksi diabeteksen sekä sydän- ja verisuonitautien riski todennäköisesti kasvaa (Saylor ym. 2013). Vaikka hoitovaste on ensin hyvä suurimmalla osalla potilaista, syöpä kehittyy lähes poikkeuksetta vähitellen kastratioresistentiksi. IAS (Intermittent androgen suppression) eli jaksottainen androgeenisalpaus on levinneen eturauhassyövän hoitomuoto, jossa lääkkeellinen kastratio keskeytetään PSA-arvon (Prostate-specific antigen) alittaessa tietyn raja-arvon, ja aloitetaan uudelleen PSA-arvon noustessa tietyn tason yläpuolelle. Perinteisessä hoitomuodossa lääkkeellinen tai kirurginen kastratio on yhtämittaista (CAS, Continuous androgen suppression). IAS:n kehittämisen tavoitteena on ollut muun muassa hidastaa kasvaimen kehittymistä sekä vähentää hoidosta aiheutuvia sivuoireita ja kustannuksia perinteiseen kastratioon verrattuna (Fall ym. 2014).

1.1 Jaksottainen androgeenisalpaus

Jaksottaista androgeenisalpausta on verrattu yhtämittaiseen androgeenisalpaukseen useissa kliinisissä tutkimuksissa. Tulokset elossaolon, taudin etenemisen ja elämänlaadun suhteen ovat olleet vaihtelevia. Tämä selittyy muun muassa erilaisilla potilasaineistoilla, sisäänottokriteereillä ja IAS:n hoito- ja taukojaksojen PSA-raja-arvoilla. Kolme tutkimusta ei todennut merkitsevää eroa progressiossa tai kokonaiskuolleisuudessa IAS:n ja CAS:n välillä (Calais da Silva ym. 2009, Mottet ym. 2012, Salonen ym. 2012). Myöskään Crookin ym. (2012) mukaan kokonaiskuolleisuudessa ei ollut eroa, mutta progressioon kuluva aika oli IAS-ryhmässä hieman pidempi. Kyseessä oli kuitenkin todennäköisesti tutkimusprotokollasta johtuva harha. Hussain ym. (2013) totesi laajassa tutkimuksessaan kuolleisuuden olevan korkeampi IAS-ryhmässä, mutta tulos ei ollut aivan tilastollisesti merkitsevää. Yhdessä tutkimuksessa (Calais da Silva ym. 2009) kokonaiselämänlaatu oli IAS-ryhmässä hieman huonompi kuin CAS-ryhmässä, mutta ero ei ollut kliinisesti merkittävä. Suomalaisessa FinnProstate Study VII -tutkimuksessa (Salonen ym. 2013) todettiin IAS-ryhmässä olevan vähemmän aktiivisuuden rajoittumista ja fyysisen toimintakyvyn laskua sekä paremmat seksuaalitoiminnot. Hussainin ym. (2013) mukaan IAS-ryhmän elämänlaatu oli

erektiokyvykkyyden ja mielenterveyden osalta parempi 3 kk kuluttua hoidon alusta, mutta tämän jälkeen merkitseviä eroja ei ollut. Mottet ym. (2012) ei todennut kliinisesti merkittäviä eroja elämänlaadussa ryhmien välillä, mutta IAS-ryhmässä oli merkitsevästi vähemmän sivuoireita. Crook ym. (2012) ei myöskään havainnut merkittävää vaikutusta elämänlaatuun, mutta IAS-ryhmässä raportoitiin vähemmän kuumia aaltoja, virtsaamisongelmia ja seksuaalisen halukkuuden laskua. European Association of Urology tiivistää tämänhetkisen tutkimustiedon niin, että CAS:n ja IAS:n välillä ei ole merkitsevää eroa elossaolon suhteen, ja että IAS parantaa elämänlaatua vain vähän (Fall ym. 2014).

1.2 PSA

PSA (Prostate-specific antigen) on seriiniproteaasi, jota eturauhassolukko erittää siemennesteeseen. *PSA* ilmentyy voimakkaasti sekä normaalissa eturauhasessa että eturauhassyövässä, mutta ei juurikaan muissa kudoksissa. *PSA*:ta vapautuu eturauhasesta pieniä määriä verenkiertoon, ja sen seerumipitoisuutta käytetäänkin eturauhassyövän merkkiaineena. *PSA*:n seerumipitoisuuden nousua aiheuttavat kuitenkin myös muut tekijät, kuten eturauhastulehdus ja eturauhasen hyvänlaatuinen liikakasvu (BPH, benign prostatic hyperplasia), joten *PSA* ei ole eturauhassyövän suhteen spesifi. Hormonihoidon yhteydessä seerumin *PSA*-pitoisuus puolestaan laskee, koska androgeenit säätelevät *PSA*:n ilmentymistä eturauhaskudoksessa. (Stenman ym. 1999.)

1.3 AR

AR (Androgen receptor) on steroidihormonireseptori, jolla on keskeinen merkitys eturauhassyövän patogeneesissä. AR aktivoituu androgeenien sitoutuessa siihen, dimerisoituu, sitoutuu DNA:han ja säätelee kohdegeenien ilmentymistä. (Linja ym. 2004.) Voisi olettaa, että *AR*-signaali vähenisi huomattavasti kastration yhteydessä, koska luonnolliset ligandit (androgeenit) eliminoituvat lähes täysin. Eturauhassyöpä voi kuitenkin muuttua hypersensitiiviseksi androgeenien suhteen, jolloin *AR*-signaali jatkuu kastratiosta huolimatta. Yksi keskeinen mekanismi on *AR*-geenin monistuma eli amplifikaatio (Linja ym. 2004). *AR*:n tärkeyttä eturauhassyövässä korostaa se, että *AR*-signaali on suorastaan välttämätöntä kastratioresistenteille syöpäsoluille, vaikka androgeenit puuttuisivatkin (Zegarra-Moro ym. 2002).

1.4 ERG

1.4.1 Yleisyys

TMPRSS2:n ja *ERG*:n muodostamat fuusiogeenit tunnistettiin eturauhassyövän yhteydessä ensimmäisen kerran vuonna 2005. *ERG* kuuluu ETS-transkriptiotekijöihin, joiden muodostamien onkogeenisten translokaatioiden oli jo tuolloin havaittu vaikuttavan Ewingin sarkooman ja myeloidisen leukemian syntyyn. Fuusiogeenimuodostuksen seurauksena eturauhasessa ilmentyvän *TMPRSS2*:n 5'-päässä sijaitseva androgeenisäädeltä promoottorialue liittyy *ERG*:n 3'-päähän, jolloin *ERG* tulee androgeenisäätelyn alaiseksi. Tämä johtaa *ERG*:n yliekspressioon syöpäkudoksessa. (Tomlins ym. 2005.) Tuoreemmissa tutkimuksissa on havaittu, että *TMPRSS2*:n lisäksi *ERG* voi muodostaa fuusiogenejä myös ainakin *SLC45A3*:n ja *NDRG1*:n kanssa. *ERG* on uudelleenjärjestynyt noin joka toisessa eturauhassyövässä. Esguevan ym. (2010) mukaan *ERG*:n fuusiopartneri on yksistään *TMPRSS2* 78 %:ssa tapauksista ja *SLC45A3* 6 %:ssa; molempia esiintyy samanaikaisesti 11 %:ssa kasvaimista ja 5 %:ssa puolestaan ei havaita kumpaakaan.

1.4.2. Fuusiomekanismit

ERG ja *TMPRSS2* sijaitsevat kromosomissa 21 vain noin 3 miljoonan emäsparin päässä toisistaan, ja ne voivat fuusioitua deleetion tai translokaation seurauksena. Onkogeenisten translokaatioiden on osoitettu lisääntyvän *in vitro* androgeenireseptorin (AR) aktivaation ja genotoksisen stressin (esimerkiksi ionisoiva säteily) yhteydessä synergisesti. AR:n aktivaatio muun muassa muokkaa kromosomien rakenteita niin, että translokaatiokohdat lähenevät toisiaan, ja stimuloi DNA-katkoksille altistavia entsyymejä. (Lin ym. 2009.) Attardin ym. (2008) mukaan eturauhassyöpä voidaan jakaa kolmeen pääryhmään *ERG*-fuusiogeenistatuksen mukaan: N-luokka (ei fuusiota), Edel (deleetio) ja Esplit (translokaatio). Edel-luokan havaittiin olevan yhteydessä suurempaan syöpäspesifiin kuolleisuuteen kuin N-luokka (HR = 1,72; 95 %:n luottamusväli 1,02–2,89; p = 0,042) riippumatta Gleason-summasta, iästä tai diagnoosihetken PSA-tasosta. Erityisen huono ennuste (HR = 6,10; 95 %:n luottamusväli 3,33–11,15; p < 0,001) puolestaan liittyi 2+Edel-alaluokkaan, jossa havaitaan vähintään kaksi deleetion seurauksena syntynyttä *TMPRSS2:ERG*-fuusiota yhtä tumaa kohti. Esplit-luokan ennuste ei poikennut merkitsevästi N-luokasta, mikä selittynee *ERG*:n ja *TMPRSS2*:n välisen geenisekvenssin säilymisellä. Tällä välillä sijaitsee todennäköisesti jokin syövän kasvua hillitsevä tekijä, joka menetetään deleetion yhteydessä. (Attard ym. 2008.)

1.4.3 Vaikutus solutasolla

ERG on transkriptiotekijä, jolle tunnetaan useita kohdegeenejä. *ERG*-ekspression on osoitettu lisäävän muun muassa *MMP9*- ja *PLXNA2*-geenien ilmentymistä eturauhassyöpäsoluissa *in vitro*. Näistä jälkimmäinen pystytettiin yhdistämään solujen motiliteettiin ja invasiivisuuteen. (Tian ym. 2014) *ERG* lisää myös *SOX4*-geenin ilmentymistä, ja yhdessä nämä edistävät syöpäsolujen epiteeli-mesenkyymitransitiota (Wang ym. 2014). Pelkkä *ERG*-ekspressio ei todennäköisesti muuta eturauhassoluja pahanlaatuisiksi. *PTEN*-deletion yhteydessä *ERG* kuitenkin lisää AR-signaalointia sekä lisää solukuolemaa, migraatiota, tulehdusta ja angiogeneesiä säätelevien geenien luentaa, mikä altistaa aggressiiviselle eturauhassyövälle. (Chen ym. 2013.)

1.4.4 Vaikutus taudin ennusteeseen

Xu ym. (2014) julkaisivat oman tutkimuksensa yhteydessä kattavan katsauksen aiemmista tutkimuksista, joissa oli tutkittu *ERG*-positiivisuuden yhteyttä eturauhassyövän ennusteeseen. Aineisto käsitti 54 tutkimusta, joissa oli yhteensä 14 376 miestä. *ERG*-positiivinen syöpä näyttää olevan yhteydessä matalampaan preoperatiiviseen PSA-tasoon ja korkeampaan AJCC-luokitukseen kuin *ERG*-negatiivinen. Tulokset eivät kuitenkaan olleet yhdenmukaisia. *ERG*-status ei vaikuta olevan yhteydessä Gleason-summaluokitukseen, biokemialliseen uusiutumiseen tai eturauhassyöpäspesifiin kuolleisuuteen. Kirjoittajien mukaan on kuitenkin mahdollista, että *ERG*-positiivisuus on tärkeä ennustetekijä jossakin eturauhassyövän histologisessa tai geneettisessä alatyypissä. (Xu ym. 2014.) Tässä julkaisussa ei tarkasteltu fuusiomekanismin mukaisia alaluokkia.

Aiheesta on myös toinen laaja meta-analyysi: Pettersson ym. (2012) totesivat 47 tutkimusta käsittäneessä aineistossaan, että *ERG*-ekspressio ei vaikuttanut eturauhassyövän biokemialliseen uusiutumiseen (yhteensä 5 074 miestä) tai letaalin taudinmuodon kehittymiseen (yhteensä 2 049 miestä). Sen sijaan *ERG*-statuksella oli yhteys korkeampaan stage-luokitukseen. Tämä meta-analyysi ei tukenut hypoteesia, jonka mukaan Edel-luokan geenifuusio johtaisi huonompaan ennusteeseen kuin Esplit-luokan, mutta fuusiomekanismi oli selvitetty vain osassa tutkimuksista. (Pettersson ym. 2012)

Leinonen ym. (2013) totesivat *ERG*-ekspression olevan yhteydessä hyvään ennusteeseen. *ERG*-ekspressio ei vaihdellut merkittävästi varhaisen taudin ja kastroatioresistenttien metastaasien välillä, minkä perusteella voidaan olettaa, ettei *ERG*-ekspressio yksinään selitä eturauhassyövän aggressiivisuutta molekyylitasolla. Sen sijaan *PTEN*-deletio oli ennustetta heikentävä tekijä

ainoastaan *ERG*-positiivisissa tapauksissa, joten *ERG*:llä saattaa olla muita onkogeenisiä signalointireittejä voimistava vaikutus. (Leinonen ym. 2013.) Tämä tukee Chenin ym. (2013) havaintoa *ERG*:n molekyyli-tason vaikutuksista *PTEN*-delektion yhteydessä.

Wu ym. (2013) ovat kehittäneet hypoteesin, jonka mukaan *TMPRSS2:ERG*:n biologinen vaikutus voisi riippua siitä, minkälaisia *ERG*-proteiinia solut tuottavat. *TMPRSS2* ja *ERG* voivat fuusioitua useista vaihtoehtoisista kohdista: tällä hetkellä tunnetaan ainakin 19 erilaista fuusiosekvenssiä, joista osa johtaa normaalia lyhyemmän *ERG*-proteiinin muodostumiseen. Nämä lyhentyneet *ERG*-proteiinit saattavat DNA:han sitoutuessaan estää kompetitiivisesti normaalien, täysimittaisten *ERG*-proteiinien toimintaa ja aggressiivisen fenotyypin syntyä. Tämä voisi selittää, miksi *ERG*-ekspressiota ei ole pystytty liittämään yksiselitteisesti huonoon tai hyvään ennusteeseen. Hypoteesia ei kuitenkaan ole vielä testattu. (Wu ym. 2013.)

1.5 Tutkimuksen tarkoitus

Jaksottaisen androgeenisalpauksen ja *ERG*-ekspression välistä yhteyttä ei ole aiemmin tutkittu. Ensisijaisena tutkimuskysymyksenä on, vaihtelee *ERG*-ekspressio samalla potilaalla IAS-hoidon aikana. Tutkimushypoteesina on, että *ERG*-ekspressio on voimakkaampaa taukojaksojen jälkeen, koska niiden aikana veren testosteronin androgeenivaikutus pääsee indusoimaan androgeenisensitiivisen *TMPRSS2*:n kautta *ERG*:n ilmentymistä niissä soluissa, joissa on tapahtunut *TMPRSS2:ERG*-fuusio. Hoitojaksojen jälkeen *ERG*-ekspression pitäisi olla heikompaa, joten oletettavasti *ERG*-ekspressio aaltoilee hoidon edetessä. Toissijaisesti tutkitaan myös *PSA*:n ja *AR*:n ilmentymistä samoista näytteistä.

2 AINEISTO JA MENETELMÄT

2.1 Aineisto

Samaa aineistoa on käytetty aiemmassa tutkimuksessa, jossa se on kuvattu tarkemmin (Laitinen ym. 2007). Lyhyesti todettakoon, että alun perin aineistona oli 92 biopsianäytettä yhteensä 12:lta eri potilaalta, jotka sairastivat levinnyttä eturauhassyöpää. Potilaat osallistuivat IAS-tutkimukseen, jonka yhteydessä heiltä otettiin säännöllisesti eturauhasbiopsioita. Tähän tutkimukseen valikoitui alkuperäisestä 29 potilaasta 12 IAS-ryhmään kuulunutta potilasta, jotka olivat pitkään seurannassa. Tarkoituksena oli saada ajallinen vaihtelu mahdollisimman hyvin esiin. Jokainen näyte fiksoitiin formaliinilla, valettiin paraffiiniin ja leikattiin useiksi 4 µm:n paksuisiksi leikkeiksi, jotka kiinnitettiin näytelaseihin kuumentamalla. Jokaisesta näytteestä käytettiin neljä leikettä: yksi HE-värjäykseen (hematoksyliini ja eosiini) ja kolme immunohistokemiallisiin värjäyksiin (ERG, PSA ja AR). ERG-värjäykset olivat käyttökelpoisia yhteensä 23:ssa näytteessä (25 % alkuperäisestä) 6:lta eri potilaalta. Näiden potilaiden kliinisiä tietoja on esitetty *Taulukossa 1* ja seerumin PSA:n vaihtelu *Kuvaajassa 1*. Pääasialliset syyt näytteiden hylkäämiseen olivat syöpäkudoksen puuttuminen ja negatiivisen kontrollinäytteen värjäytyminen. Vastaavista PSA-värjäyksistä käyttökelpoisia oli 19 ja AR-värjäyksistä 22. Viiden potilaan kaikki edustavat näytteet on otettu kolmen ensimmäisen hoitosyklin aikana, mutta yhden potilaan näytteet jatkuvat 13. kastroatiojaksoon saakka.

Potilas nro	Ikä dg	PSA dg	GS dg	T	M
1	77,4	321	7	4	1
2	74,2	162	8	4	0
3	77,5	51	10	4	1
4	77,5	21	7	3	1
5	64,4	166		3	0
6	73,7	23	9	4	0
Keskiarvo	74,1	123,9	8,2		

Taulukko 1. Kustakin potilaasta on ilmoitettu ikä (vuosina), seerumin PSA-arvo (µg/l) ja Gleason-summa (engl. Gleason score) diagnoosihetkellä (Ikä dg, PSA dg ja GS dg) ja kasvaimen TNM-luokituksesta T ja M (T = tumour, M = metastasis). Potilaan 5 Gleason-summa ei ole tiedossa. Iästä, seerumin PSA-arvosta ja Gleason-summasta on ilmoitettu keskiarvot.

kannelliseen muovikammioon, ja vasta-aineinkubaatiota jatkettiin kylmähuoneessa (4 °C) yön yli.

Seuraavana päivänä värjäystelineet otettiin pois kammioista ja tuotiin takaisin huoneenlämpöön. Kaikki lasit pestiin kolmesti TBS-Tweenillä. PSA- ja AR-värjättäville näytteille tehtiin tässä vaiheessa post-blokkaus. Näihin näytteisiin pipetoitiin 100 µl Post-antibody blocking solution -liuosta (Immunologic), jonka annettiin inkuboitua 20 minuuttia. Tätä seurasi kolme pesua TBS-Tweenillä. Tästä eteenpäin protokolla on samanlainen myös ERG-värjättäville laselle. Laseihin pipetoitiin 100 µl Poly-HRP-GAM/R/R IgG -sekundaarivasta-ainetta (Immunologic), ja inkubaatio kesti 30 minuuttia. Seurasi jälleen kolme pesua TBS-Tweenillä. Laseille pipetoitiin 100 µl DAB-väriainetta suhteella 1:50 (UltraVision Detection System, Thermo Scientific). Näytteet huuhdeltiin kertaalleen tislattulla vedellä. Tämän jälkeen lasit otettiin pois värjäystelineistä ja laitettiin värjäyskelkkaan hematoksyliini-vastavärjäystä varten. Lasit kastettiin Mayerin hematoksyliiniin (1:2) 15 sekunniksi ja huuhdeltiin tämän jälkeen juoksevassa vedessä. Dehydraatio tehtiin laskevalla alkoholisarjalla: 70 % etanoli 1 minuutti, 95 % etanoli 2 minuuttia ja absoluuttinen etanoli 2+1 minuuttia. Tätä seurasi ksyleeni 2x3 minuuttia. Peitinlasit kiinnitettiin koneellisesti ksyleeniliukoosella petausaineella.

HE-värjäykset tehtiin koneellisesti. Ohjelmaan kuului deparaffinisaatio ennen värjäyksiä hematoksyliinilla ja eosiinilla. Ohjelman jälkeen laselle suoritettiin dehydraatio ja peitinlasien kiinnitys samalla tavalla kuin immunohistokemiallisesti värjättäville laselle.

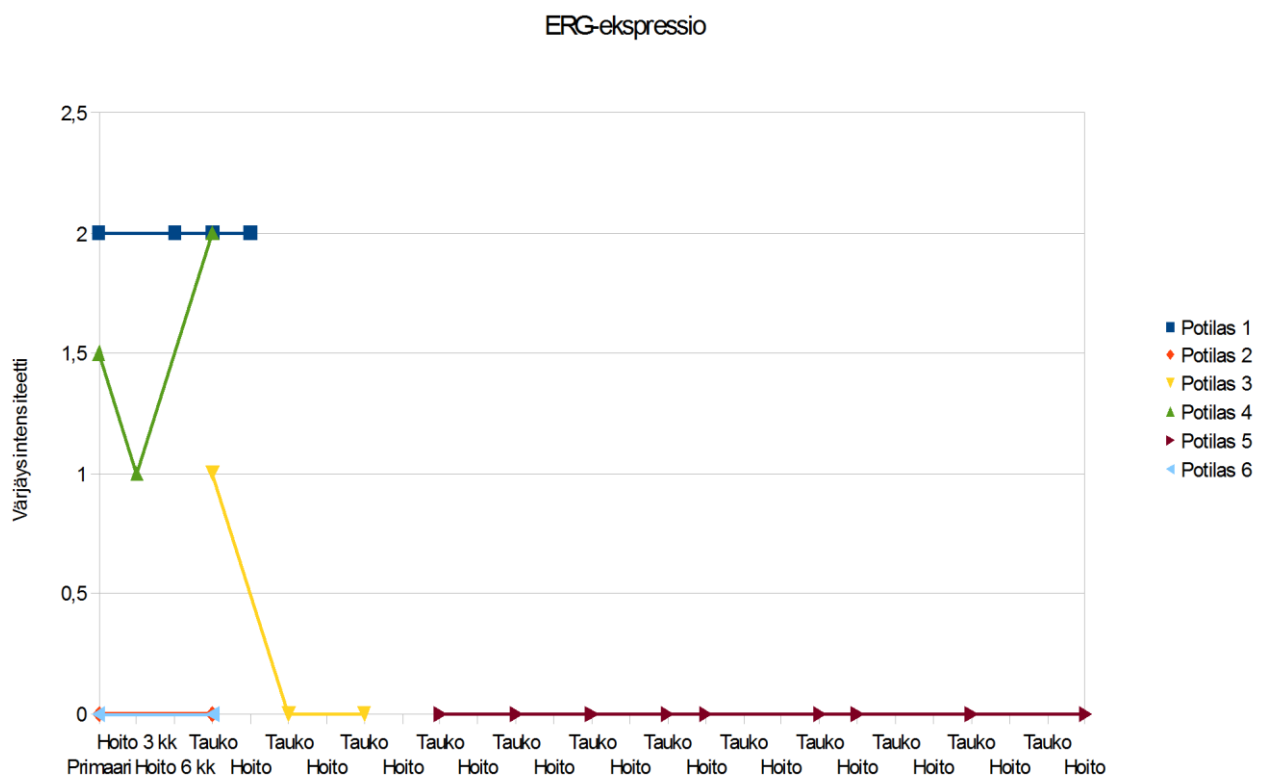
2.3 Värjäytymisintensiteetin arviointi

Kaikkien immunohistokemiallisten värjäysten intensiteetti arvioitiin kolmiportaisella asteikolla: 0 = ei värjäytymistä, 1 = kohtalaista värjäytymistä, 2 = voimakasta tai hyvin voimakasta värjäytymistä. Alun perin tarkoituksena oli käyttää neliportaista asteikkoa 0-3, mutta ryhmän 3 mukaista hyvin voimakasta värjäytymistä todettiin niin vähän, että ryhmät 3 ja 2 yhdistettiin ryhmäksi 2. Jos samalla näytteenottokerralla oli otettu kaksi eri biopsiaa, näiden värjäytymisintensiteeteistä otettiin keskiarvo. Erityistä huomiota kiinnitettiin siihen, että värjäysintensiteetti arvioitiin ainoastaan syöpäkudoksesta eikä hyvänlaatuisesta prostatan epiteelistä, HGPIN:stä (High-grade prostatic intraepithelial neoplasia) tai ERG:n tapauksessa endoteelisoluista tai lymfosyyteistä. HE-värjäyksiä käytettiin tunnistamisen tukena. Epäselvät näytteet tarkasti syöpägenetiikan professori Tapio Visakorpi.

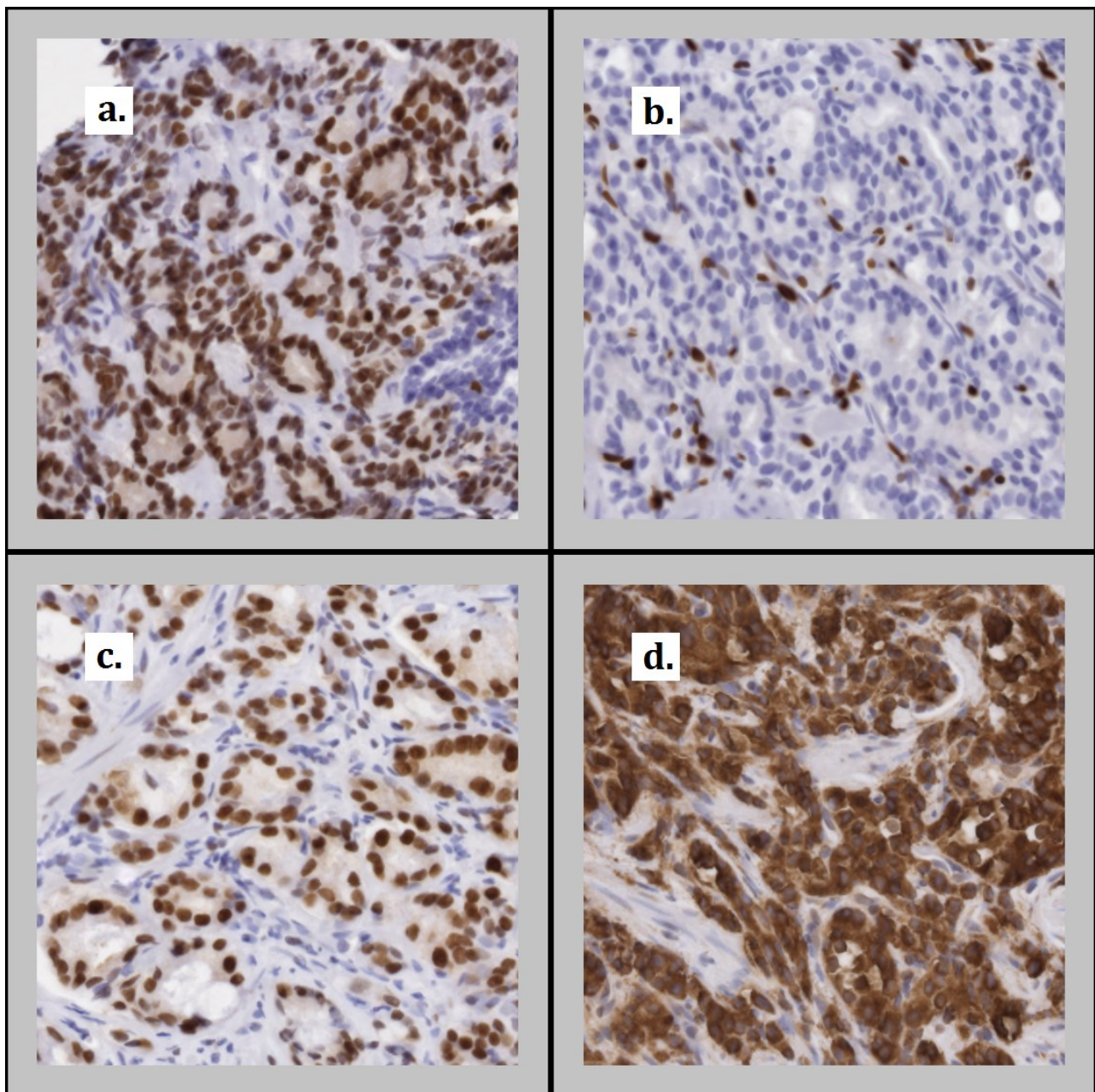
3 TULOKSET

3.1 ERG-ekspressio

Vähintään yksi ERG-positiivinen näyte oli kolmella potilaalla (50 %). Viidellä potilaalla (83 %) kasvain oli johdonmukaisesti ERG-positiivinen tai -negatiivinen, mutta yhdellä potilaalla esiintyi yhden heikosti positiivisen näytteen lisäksi kaksi negatiivista. Värjäysintensiteetin hoidollisesta vaihtelusta ei saada viitteitä, vaan intensiteetti näyttää pysyvän melko vakaana.



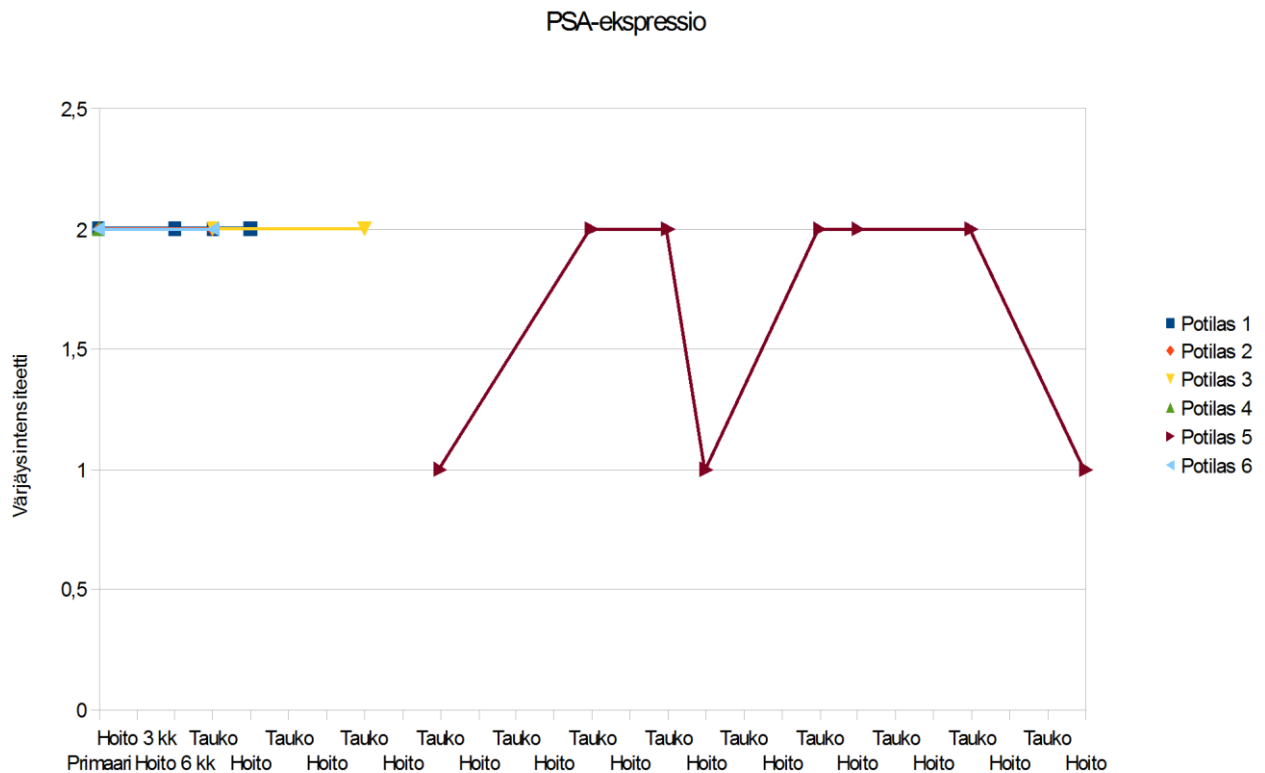
Kuvaaja 2. ERG:n värjäysintensiteetin vaihtelu IAS:n aikana.



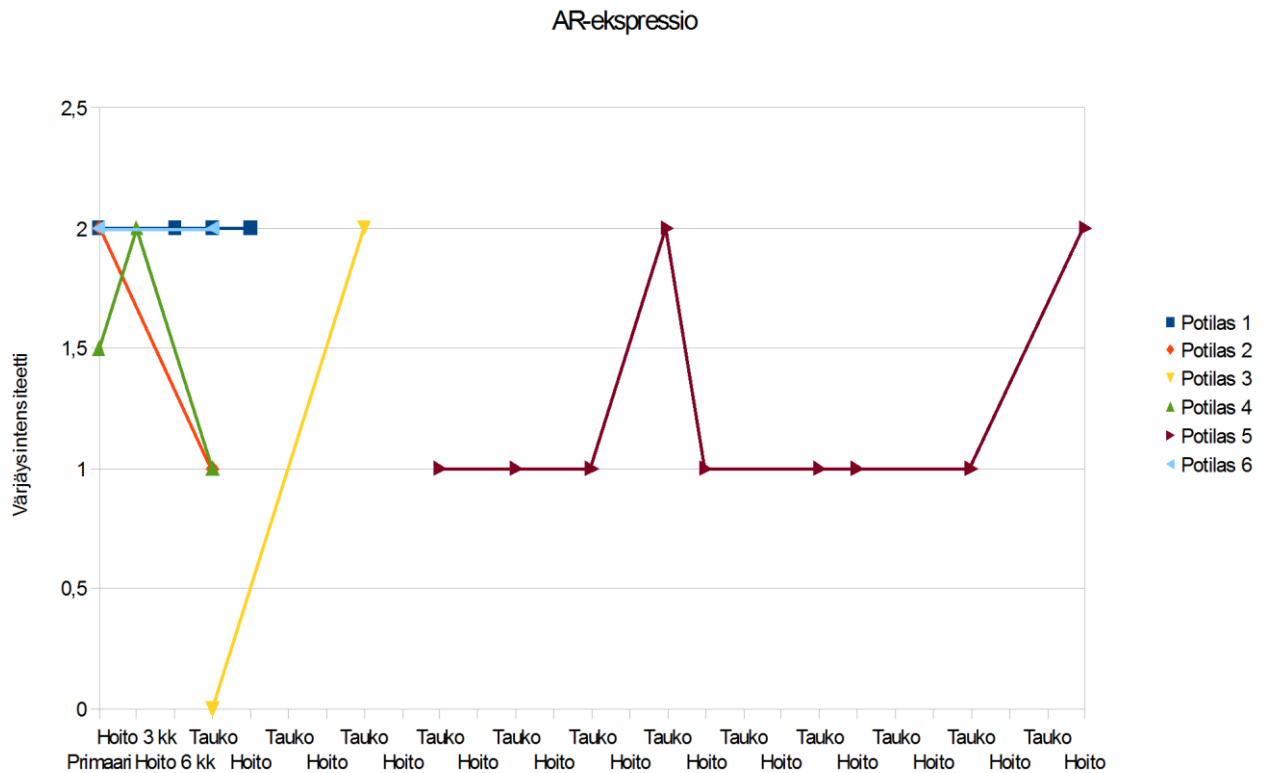
*Kuva 1. Esimerkkejä immunohistokemiallisista värjäyksistä: **a.** ERG, värjäysintensiteetti 2; **b.** ERG, värjäysintensiteetti 0 (kuvassa näkyvät ERG-positiiviset solut ovat todennäköisesti kaikki endoteelisoluja); **c.** AR, värjäysintensiteetti 2; **d.** PSA, värjäysintensiteetti 2.*

3.2 PSA- ja AR-ekspressio

Kaikki näytteet olivat PSA-positiivisia. Värjäytyminen oli enimmäkseen (84 %) voimakasta (intensiteetti 2). Selkeää hoidollista vaihtelua ei havaita. AR-värjäytymisessä oli jonkin verran vaihtelua: voimakasta värjäytymistä (intensiteetti 2) todettiin 50 %:ssa näytteistä, lievää (intensiteetti 1–1,5) 45 %:ssa ja yksi näyte (5 %) oli täysin negatiivinen. Tämä vaihtelu ei kuitenkaan ollut johdonmukaista hoito- ja taukojaksojen välillä.



Kuvaaja 3. PSA:n värjäysintensiteetin vaihtelu IAS:n aikana.



Kuvaaja 4. AR:n värjäysintensiteetin vaihtelu IAS:n aikana.

4 POHDINTAA

Androgeenisalpaushoidoilla pyritään vähentämään eturauhassyöpäsolujen kasvua estämällä AR-signalointia. Lopulta kasvaimet kuitenkin kehittyvät kastraatioresistenteiksi. Tämä tutkimus osoittaa, että syöpäsoluissa tapahtuu AR-signalointia myös kastraation aikana eikä vain kastraatiojaksojen välillä. Mahdollisia mekanismeja on monia: jatkuvasti aktiiviset, ligandista riippumattomat AR:n transkriptiovariantit (Guo ym. 2009); heikkojen androgeenien muuntaminen testosteroniksi ja dihydrotestosteroniksi syöpäsoluissa (Stanbrough ym. 2006); ja AR-geenin monistuminen (Linja ym. 2004).

Yksi jaksottaisen androgeenisalpauksen toivotuista eduista oli eturauhassyövän progression hidastaminen. Hypoteesina oli, että kastraation tauotessa androgeenit saavat aikaan syöpäsolujen erilaistumista ja palauttavat näiden apoptoosikyvyn. Tällä tavoin kasvain olisi herkkä useille kastraatiojaksoille. (Gleave ym. 1998) Nykytiedon valossa progressio ei kuitenkaan hidastu yhtämittaiseen kastraatioon verrattuna (Botrel ym. 2014, Mottet ym. 2011, Salonen ym. 2011).

Tässä tutkimuksessa tarkastelun kohteena olleet *PSA* ja *TMPRSS2:ERG* ovat AR:n kohdegeenejä androgeenisensitiivisessä eturauhassyövässä (Wang ym. 2009). Koska *PSA*:n ja *ERG*:n ilmentyminen ei vaihtelee hoito- ja taukojaksojen välillä, näyttää siltä, että kudostasolla ei saada aikaan sellaisia vaikutuksia kuin Gleave ym. (1998) esittivät. On mahdollista, että IAS:n ja CAS:n välillä ei ole ratkaisevaa eroa kuolleisuudessa tai progressioon kuluva ajassa juuri tästä syystä. Huomattavaa on myös se, että *PSA*:n ilmentyminen ei muutu syöpäkudoksessa, vaikka sen pitoisuus seerumissa vaihtelee huomattavasti.

AR:n roolista kastratioresistentin eturauhassyövän patofysiologiassa on saatu uutta tietoa viime vuosina. Ilman ligandia aktivoituneella AR:lla on eri kohdegeenit kuin ligandin aktivoimalla AR:lla, ja AR toimiikin siis eri tavalla kastratiosensitiivisessä ja -resistentissä eturauhassyövässä (Wang ym. 2009). Yksi keskeinen kastratioresistentin eturauhassyövän kasvua edistävä kohdegeeni, jonka ilmentymistä ligandista riippumaton AR lisää, on *c-Myc* (Gao ym. 2013). Toinen tärkeä kohdegeeni on *UBE2C*, joka edistää solujen siirtymistä solusyklin M-vaiheeseen (Wang ym. 2009). Koska AR voi aktivoida syövän progression kannalta tärkeitä geenejä androgeeneistä riippumatta, on selvää, että pelkkä androgeenisalpaus ei ole riittävä hoitomuoto levinneen eturauhassyövän hoidossa. Ligandista riippumattoman AR-aktivaation esto voisi olla ideaalinen hoitomuoto (Gao ym. 2013).

Tämän tutkimuksen biopsianäytteet saatiin samasta potilasaineistosta, jota myös Laitinen ym. (2007) käyttivät tutkimuksessaan. He tutkivat IAS:n vaikutuksia Gleason-summaan, syöpäsolujen proliferaatio- ja apoptoosiaktiivisuuteen sekä *AR*-ekspressioon. He havaitsivat, että syöpäkudoksessa tapahtuu *AR*-signaalointia myös kastratiojaksojen aikana, mikä on johdonmukainen löydös tämän tutkimuksen tuloksen kanssa. Syöpäsolujen proliferaatio väheni ensimmäisen hoitojakson aikana, mutta seuraavilla kastratioilla ei ollut vaikutusta. Apoptoosiaktiivisuus ei osoittanut johdonmukaista vaihtelua hoito- ja taukojaksojen välillä. (Laitinen ym. 2007.) Nämä löydökset ovat ristiriidassa Gleaven ym. (1998) esittämän hypoteesin kanssa, jonka mukaan kastration keskeyttämisen pitäisi palauttaa syöpäsolujen apoptoosikyky. Gleason-summa ei myöskään osoittanut selkeää vaihtelua, mikä osaltaan saattoi johtua siitä, että suurella osalla kasvaimista oli jo lähtökohtaisesti korkea luokitus. Joka tapauksessa nämä löydökset viittaavat siihen suuntaan, että kasvaimen biologinen aggressiivisuus määräytyy jo varhaisessa vaiheessa. (Laitinen ym. 2007.)

Tämän tutkimuksen keskeisin havainto on, että eturauhassyöpäkudoksessa tapahtuu *AR*-signaalointia IAS:n aikana riippumatta seerumin androgeenitasojen vaihtelusta. Näin voidaan väittää sillä perusteella, että *AR*:n tai sen kohdegeenien, *PSA*:n ja *TMPRSS2:ERG*:n, ekspressio ei osoita

johdonmukaista vaihtelua IAS:n hoito- ja taukojaksojen välillä. Koska seerumin PSA-tasot kuitenkin reagoivat kastreatiojaksoihin, ainakin osa syöpäkudoksesta on androgeenisensitiivistä. Sen sijaan on epäselvää, onko osa syöpäsoluista kastreatioresistenttejä jo diagnoosihetkellä vai kehittykö tämä ominaisuus vasta hormonihoitojen aikana. Tämä tutkimus osoittaa osaltaan, että eturauhassyövän taudinkulku saattaa olla geneettisesti määräytynyt jo varhain, eikä jaksottainen androgeenisalpaus välttämättä muuta sitä merkittävästi. Lisäksi tämä tutkimus osoittaa, että kastreatiolla ei saada estettyä AR:n toimintaa tarpeeksi voimakkaasti, joten tulevaisuudessa eturauhassyövän hoidossa tulisi kiinnittää entistä enemmän huomiota *AR*-signaalointia suoraan estäviin lääkeaineisiin. Tutkimuksen heikkouksiin on kuitenkin laskettava aineiston pieni koko ja immunohistokemiallisen värjäysintensiteetin käyttö geeniekspression mittarina. Aiheesta pitäisi tehdä lisätutkimuksia laajemmilla aineistoilla ja tarkemmilla menetelmillä.

KIRJALLISUUS

Attard G, Clark J, Ambrosine L ym. Duplication of the fusion of *TMPRSS2* to *ERG* sequences identifies fatal human prostate cancer. *Oncogene* 2008;27:253–63

Botrel TE, Clark O, dos Reis RB ym. Intermittent versus continuous androgen deprivation for locally advanced, recurrent or metastatic prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *BMC Urology* 2014;14:9 (sähköinen viite)

Calais da Silva FE, Bono AV, Whelan P ym. Intermittent Androgen Deprivation for Locally Advanced and Metastatic Prostate Cancer: Results from a Randomised Phase 3 Study of the South European Urology Group. *Eur Urol* 2009;55:1269–77

Chen Y, Chi P, Rockowitz S ym. ETS factors reprogram the androgen receptor cistrome and prime prostate tumorigenesis in response to PTEN loss. *Nat Med* 2013;19:1023–9

Crook JM, O'Callaghan CJ, Duncan G ym. Intermittent Androgen Suppression for Rising PSA Level after Radiotherapy. *New Engl J Med* 2012;367:895–903

Esgueva R, Perner S, LaFargue CJ. Prevalence of *TMPRSS2-ERG* and *SLC45A3-ERG* gene fusions in a large prostatectomy cohort. *Modern Pathol* 2010;23:539–46

Fall M, Baranowski AP, Elneil S ym. European Association of Urology. Online Guidelines 2014. http://www.uroweb.org/guidelines/online-guidelines/?no_cache=1 Viitattu 6.6.2014

Gao L, Schwartzman J, Gibbs A ym. Androgen Receptor Promotes Ligand-Independent Prostate Cancer Progression through c-Myc Upregulation. *PloS ONE* (sähköinen aineisto) 2013;8:e63563

Gleave M, Goldenberg SL, Bruchovsky N ym. Intermittent androgen suppression for prostate cancer: rationale and clinical experience. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 1998;1:289–96

Guo Z, Yang X, Sun F ym. A Novel Androgen Receptor Splice Variant Is Up-regulated during Prostate Cancer Progression and Promotes Androgen Depletion -Resistant Growth. *Cancer Res* 2009;69:2305–13

Hussain M, Tangen CM, Berry DL ym. Intermittent versus Continuous Androgen Deprivation in Prostate Cancer. *New Engl J Med* 2013;368:1314–25

Kim J, Goetzee GA. Prostate Specific Antigen Gene Regulation by Androgen Receptor. *J Cell Biochem* 2004;93:233–41

Laitinen S, Martikainen PM, Tammela TLJ ym. Cellular Changes in Prostate Cancer Induced by Intermittent Androgen Suppression. *Eur Urol* 2007;52:725–32

Leinonen KA, Saramäki OR, Furusato B ym. Loss of PTEN Is Associated with Aggressive Behavior in ERG-Positive Prostate Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2013;22:2333–44

Lin C, Yang L, Tanasa B ym. Nuclear Receptor-Induced Chromosomal Proximity and DNA Breaks Underlie Specific Translocations in Cancer. *Cell* 2009;139:1069–83

Linja MJ, Visakorpi T. Alterations of androgen receptor in prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004;92:255–64

Mottet N, Van Damme J, Loulidi S ym. Intermittent hormonal therapy in the treatment of metastatic prostate cancer: a randomized trial. *BJU Int* 2012;110:1262–9

Pettersson A, Graff RE, Bauer SR ym. The TMPRSS2:ERG Rearrangement, ERG Expression, and Prostate Cancer Outcomes: A Cohort Study and Meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2012;21:1497–509

Salonen AJ, Taari K, Ala-Opas M ym. The FinnProstate Study VII: Intermittent Versus Continuous Androgen Deprivation in Patients With Advanced Prostate Cancer. *J Urology* 2012;187:2074–81

Salonen AJ, Taari K, Ala-Opas M ym. Advanced Prostate Cancer Treated with Intermittent or Continuous Androgen Deprivation in the Randomised FinnProstate Study VII: Quality of Life and Adverse Effects. *Eur Urol* 2013;63:111–20

Saylor PJ, Smith MR. Metabolic Complications of Androgen Deprivation Therapy for Prostate Cancer. *J Urology* 2010;189:34–42

Sharifi N, Gulley JL, Dahut WL. Androgen Deprivation Therapy for Prostate cancer. *JAMA-J Am Med Assoc* 2005;294:238–44

Stanbrough M, Bubley GJ, Ross K ym. Increased Expression of Genes Converting Adrenal Androgens to Testosterone in Androgen-Independent Prostate Cancer. *Cancer Res* 2006;66:2815–25

Stenman UH, Leinonen J, Zhang WM ym. Prostate-specific antigen. *Semin Cancer Biol* 1999;9:83–93

Suomen Syöpärekisteri. Ajantasaiset perustaulukot.

<http://www.cancer.fi/syoparekisteri/tilastot/ajantasaiset-perustaulukot/koko-maa/> Viitattu 5.6.2014

Tian TV, Tomavo N, Huot L ym. Identification of novel TMPRSS2:ERG mechanisms in prostate

cancer metastasis: involvement of MMP9 and PLXNA2. *Oncogene* 2014;33:2204–14

Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S *et al*. Recurrent Fusion of *TMPRSS2* and ETS Transcription Factor Genes in Prostate Cancer. *Science* 2005;310:644–8

Wang L, Li Y, Yang X *et al*. ERG-SOX4 Interaction Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition in Prostate Cancer Cells. *Prostate* 2014;74:647–58

Wang Q, Li W, Zhang Y *et al*. Androgen Receptor Regulates a Distinct Transcription Program in Androgen-Independent Prostate Cancer. *Cell* 2009;138:245–56

Wu F, Ding S, Lu J. Truncated ERG proteins affect the aggressiveness of prostate cancer. *Med Hypotheses* 2013;80:490–3

Xu B, Chevarie-Davis M, Chevalier S *et al*. The prognostic role of ERG immunopositivity in prostatic acinar adenocarcinoma: a study involving 454 cases and review of the literature. *Hum Pathol* 2014;45:488–97

Zegarra-Moro OL, Schmidt LJ, Huang H *et al*. Disruption of Androgen Receptor Function Inhibits Proliferation of Androgen-refractory Prostate Cancer Cells. *Cancer Res* 2002;62:1008–13